

## UTICAJ RAZLIČITIH DODATAKA NA PROBIOTSKI KARAKTER FERMENTISANOG NAPITKA NA BAZI SURUTKE\*

Maja Lj. Bulatović<sup>1\*\*</sup>, Marica B. Rakin<sup>1</sup>, Maja S. Vukašinović-Sekulić<sup>1</sup>,  
Ljiljana V. Mojović<sup>1</sup>, Tanja Ž. Krunic<sup>2</sup>

(ORIGINALNI NAUČNI RAD)  
UDK 637.344:641.1

<sup>1</sup>Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

<sup>2</sup>Inovacioni centar Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

U ovom radu ispitan je uticaj različitih izvora azota, vitamina i minerala na rast soja *Lactobacillus johnsonii* NRRL B-2178 u cilju postizanja maksimalnog broja živih ćelija pri proizvodnji probiotičkog napitka na bazi surutke. Analiza uticaja pojedinačnih i združenih efekata ispitivanih dodataka vršena je primenom frakcionalnog faktorskog dizajna eksperimenata uz izvođenje minimalnog broja eksperimenata. Nakon 8 h fermentacije surutke obogaćene ispitivanim dodacima određivan je broj živih ćelija (kao odgovor sistema) u probiotičkom napitku. Statističkom obradom podataka ujedno je procenjena i količina dodataka koja je neophodna za postizanje maksimalnog broja živih ćelija u napitku. Na osnovu dobijenih rezultata, iz grupe ispitanih izvora azota najveći uticaj na rast soja *Lactobacillus johnsonii* NRRL B-2178 ostvaruje ekstrakt kvasca pri koncentraciji od 1,5 % (w/v). Kao izvori vitamina i minerala najveći uticaj na rast ćelija ispoljavaju vitamin B<sub>6</sub> i ZnSO<sub>4</sub> u koncentracijama 0,001 % i 0,3 %, respektivno. Pri ispitivanju sve tri grupe dodataka najveći broj ćelija (oko 8,80 log CFU/mL) se može ostvariti primenom maksimalne količine ekstrakta kvasca.

**Ključne reči:** surutka, napitak, probiotici, *Lactobacillus*, fermentacija

### Uvod

U biotehnološkim industrijskim procesima formulacija supstrata je od ključnog značaja za rast i produktivnost proizvodnih sojeva, u cilju postizanja maksimalnog broja živih ćelija [1]. Zadovoljavajući broj probiotičkih bakterija je neophodan uslov da bi napitak svrstao u probiotike. Postoje različita mišljenja vezana za broj bakterija koje moraju postojati u probiotičkom napitku da bi mogle da ispolje svoj efekat. Opšte prihvaćeno mišljenje je da probiotički mlečni proizvodi moraju sadržati  $\geq 10^6$  CFU/mL živih ćelija da bi ispoljili pozitivan efekat nakon konzumiranja [2]. Značajni pomaci u pogledu unapređenja proizvodnje probiotičkih napitaka mogu se postići obogaćivanjem surutke dodatkom različitih suplemenata tokom procesa fermentacije, koji pospešuju metabolizam i preživljavanje bakterija mlečne kiseline (BMK).

Zbog svog složenog proteolitičkog sistema, BMK za svoj rast zahtevaju supstrate bogate aminokiselinama, vitaminima i mineralima. Kako surutka nije prirodno stanište probiotičkih bakterija ona ne sadrži dovoljnu količinu ovih materija što samim tim iziskuje njenu suplementaciju [3].

Rezultati brojnih istraživanja [4-7] pokazuju da se produktivnost i rast bakterija mlečne kiseline mogu značajno poboljšati primenom različitih izvora azota, vitamina i mineralnih materija. U najčešće korišćene neorganske izvore azota spadaju NH<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>OH, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, dok se kao organski izvori azota veoma često koriste ekstrakt kvasca, mesni ekstrakt, pepton i tripton soja [8-11]. Mineralne soli, kao što su MgSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub> i FeSO<sub>4</sub> predstavljaju značajan izvor mikro i makro-elemenata neophodnih za pravilan metabolizam BMK [8,9]. U najčešće primenjivane faktore rasta spadaju različiti vitamini, od kojih su naročito značajni vitamini B grupe koji ostvaruju najveći uticaj na produktivnost i rast BMK [12].

U ovom radu ispitan je uticaj različitih izvora azota, vitamina i minerala na rast soja *Lb. johnsonii* NRRL B-2178 u cilju postizanja maksimalnog broja živih ćelija pri proizvodnji probiotičkog napitka na bazi surutke.

### Eksperimentalni deo

U radu je korišćena slatka surutka u prahu (Lenic Laboratories, Beograd, Srbija) sledećeg sastava: proteini 12,11 %, lipidi 1,0 %, ugljeni hidrati 69,62 %. Surutka je rekonstituisana otapanjem praha surutke u vodi prethodno sterilisanoj u autoklavu 30 min na 120 °C. Nakon rekonstituisanja uzorci od 50 mL su pasterizovani 60 min na temperaturi 60 °C, hlađeni na temperaturu fermentacije, obogaćivani suplementima i odmah zasejavani ispitivanom bakterijskom kulturom. Kao starter kultura za inokulaciju korišćen je soj *Lactobacillus johnsonii* NRRL

\* Rad saopšten na X Simpozijumu „Savremene tehnologije i privredni razvoj“ sa međunarodnim učešćem, Leskovac, 22. i 23. oktobar 2013. godine

\*\* **Adresa autora:** Maja Bulatović, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu  
Karnegijeva 4, 11000 Beograd, Srbija  
E-mail: [mbulatovic@tmf.bg.ac.rs](mailto:mbulatovic@tmf.bg.ac.rs)

Rukopis primljen: 08. avgusta 2013. godine

Rad prihvaćen: 20. septembra 2013. godine

B-2178 iz kolekcije kultura Katedre za biotehnologiju i biohemijsko inženjerstvo Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu.

Pasterizovani uzorci surutke, kod kojih je sadržaj suve materije iznosio 8 %, zasejavani su sa 8,42 % inokuluma. Početni broj ćelija u uzorku iznosio je 6,70 log(CFU/mL). Nakon dodatka izvora azota, minerala i vitamina, surutka je fermentisana 8 h na 35 °C nakon čega je određivan broj živih ćelija u proizvedenom napitku.

Broj živih ćelija određivan je standardnom metodom serijskog razblaživanja na MRS-agaru. Agarne ploče su prelivane dodatnim slojem agara radi obezbeđivanja

anaerobnih uslova neophodnih za rast korišćenog soja. Ploče su inkubirane 48 h na 37 °C, nakon čega je vršeno brojanje izraslih kolonija.

Radi analize uticaja suplemenata na ukupni broj ćelija korišćeni su delimični faktorijski planovi ( $2^{5-2}$  pri ispitivanju izvora azota i  $2^{7-4}$  pri ispitivanju izvora vitamina i mineralnih soli), u okviru programa Design Expert 8. Faktori su varirani na dva nivoa (-1, +1). Nivoi faktora za svaku grupu dodataka prikazani su u tabelama 1, 2 i 3. Ispitivani suplementi su dodavani u obliku rastvora sledećih koncentracija: izvori azota (0,50 g/mL), vitamini (0,33 g/mL) i minerali (0,15 g/mL).

**Tabela 1.** Nivoi izvora azota analiziranih pomoću delimičnog  $2^{5-2}$  faktorijskog plana eksperimenata  
**Table 1.** Levels of nitrogen sources for the  $2^{5-2}$  fractional factorial design of experiments

Promenljiva		Kodirani nivo	
		-1	1
Pepton 1	%	0	1.5
Pepton 4	%	0	1.5
Mesni ekstrakt	%	0	1.5
Ekstrakt kvasca	%	0	1.5
Tripton soja	%	0	1.5

**Tabela 2.** Nivoi vitamina analiziranih pomoću delimičnog  $2^{7-4}$  faktorijskog plana eksperimenata  
**Table 2.** Levels of vitamins for the  $2^{7-4}$  fractional factorial design of experiments

Promenljiva		Kodirani nivo	
		-1	1
Biotin	%	0	0.001
Tiamin	%	0	0.001
Piridoksal	%	0	0.001
Inozitol	%	0	0.001
Askorbinska kiselina	%	0	0.001
Pantotenska kiselina	%	0	0.001
Riboflavin	%	0	0.001

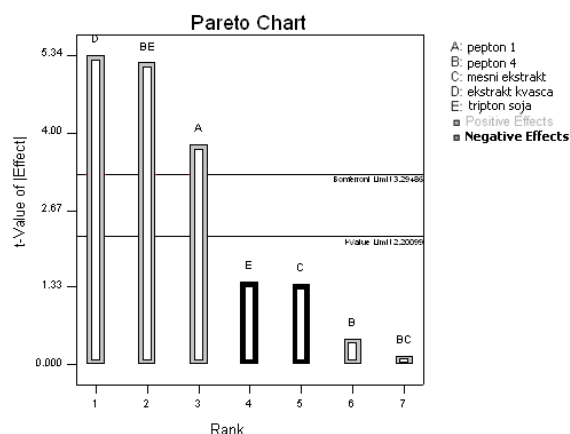
**Tabela 3.** Nivoi mineralnih soli analiziranih pomoću delimičnog  $2^{7-4}$  faktorijskog plana eksperimenata  
**Table 3.** Levels of mineral salts for the  $2^{7-4}$  fractional factorial design of experiments

Promenljiva		Kodirani nivo	
		-1	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	%	0	0.3
CH <sub>3</sub> COONa	%	0	0.3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	%	0	0.3
MgSO <sub>4</sub>	%	0	0.3
MnSO <sub>4</sub>	%	0	0.3
ZnSO <sub>4</sub>	%	0	0.3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	%	0	0.3

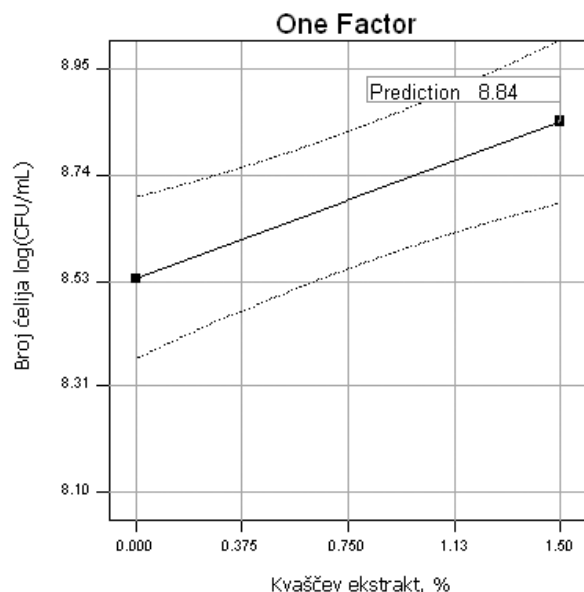
## Rezultati i diskusija

Na slici 1 prikazan je uticaj koji ispitivani izvori azota ostvaruju na rast soja *Lb. johnsonii*.

Kao što je prikazano na slici 1 najveći uticaj na broj ćelija *Lb. johnsonii* ostvaruje u ekstrakt kvasca koncentraciji od 1,5 % i više, obzirom da je ispoljen pozitivan uticaj na rast. Dobijeni rezultat je u skladu sa navodima u literaturi, prema kojima se pri ispitivanju uticaja izvora azota pored vode od močenja kukuruza [3], ekstrakta slada, hidrolizata kazeina, ekstrakt kvasca najčešće koristi kao najuticajniji faktor rasta i produktivnosti bakterija mlečne kiseline [13]. Dodatakom 1,5 % ekstrakta kvasca, nakon 8 h fermentacije postiže se maksimalni broj ćelija od 8,84 log(CFU/mL) (slika 2).



**Slika 1.** Uticaj izvora azota na rast soja *Lb. johnsonii* NRRL B-2178  
**Figure 1.** Effect of nitrogen sources on the growth of *Lb. johnsonii* NRRL B-2178

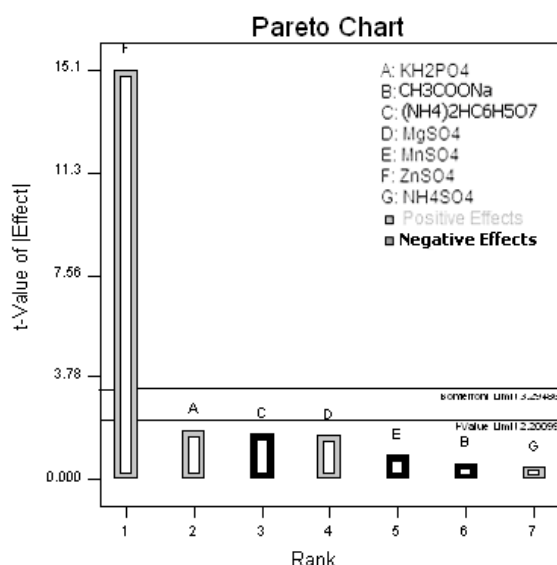


**Slika 2.** Uticaj koncentracije kvasčevog ekstrakta na broj ćelija *Lb. johnsonii* NRRL B-2178

**Figure 2.** Effect of yeast extract concentration on viable cell count of *Lb. johnsonii* NRRL B-2178

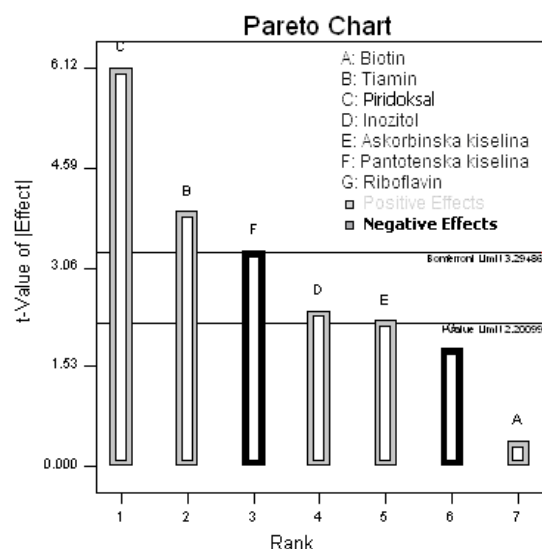
Rast ćelija BMK je direktno povezan sa koncentracijom ekstrakta kvasca, odnosno količinom nukleotida prisutnih u peptidima i proteinima kao komponentama ekstrakta kvasca koja isključivo zavisi od proizvođača samog ekstrakta [14].

Kao što je prikazano na slikama 3 i 4, najveći uticaj na broj ćelija *Lb. johnsonii* NRRL B-2178 ostvaren je dodatkom mineralne soli  $\text{ZnSO}_4$  i vitamina piridoksala. Maksimalni broj ćelija postignut dodatkom  $\text{ZnSO}_4$  iznosio je 7,88 log(CFU/mL) dok je dodatkom piridoksala iznosio 8,05 log(CFU/mL) (rezultati nisu prikazani).



**Slika 3.** Uticaj mineralnih soli na rast soja *Lb. johnsonii* NRRL B-2178

**Figure 3.** Effect of mineral salts on the growth of *Lb. johnsonii* NRRL B-2178



**Slika 4.** Uticaj vitamina na rast soja *Lb. johnsonii* NRRL B-2178

**Figure 4.** Effect of vitamins on the growth of *Lb. johnsonii* NRRL B-2178

Mikroelementi igraju važnu ulogu u ćelijskom metabolizmu, prvenstveno zbog njihove uloge kao kofaktora za veliki broj enzima. Cink u biološki relevantnom obliku, kao  $\text{Zn}^{2+}$  jon, neophodan je kao katalitički kofaktor mnogih enzima, uključujući alkalne fosfataze i nekoliko karboksipeptidaza. Cink takođe ima strukturu i funkcionalnu ulogu u sintezi proteina i nukleinskih kiselina [15].

Primenom svakog od ovih dodataka postignuti broj ćelija u napitku je bio znatno manji od maksimalnog broja postignutog primenom izvora azota koji je iznosio 8,84 log(CFU/mL). Na osnovu toga može se smatrati da minerali i vitamini nemaju značajan uticaj na rast ćelija u poređenju sa ekstraktom kvasca.

Obzirom da je uticaj minerala i vitamina značajno manji od uticaja ekstrakta kvasca, može se smatrati da surutka kao sirovina sadrži dovoljnu količinu minerala i vitamina neophodnih za rast soja *Lb. johnsonii* NRRL B-2178.

## Zaključak

Rezultati dobijeni primenom statističke obrade podataka u okviru programa Design Expert 8, ukazuju na to da se napitak unapređenih probiotskih karakteristika, sa najvećim brojem ćelija (8,84 log(CFU/mL)), dobija nakon 8 h fermentacije surutke sojem *Lb. johnsonii* NRRL B-2178 uz dodatak ekstrakta kvasca u količini od 1,5 %.

## Zahvalnica

Rad je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (Projekat: TR31017).

## Literatura

- [1] C. F. V. Souza, S. H. Flores, M. A. Z. Ayub, Optimization of medium composition for the production of transglutaminase by *Bacillus circulans* BL32 using statistical experimental methods, *Process Biochemistry*, 41 (2006) 1186-1192.
- [2] A. Hernandez-Mendoza, V. J. Robles, J. O. Angulo, J. De La Cruz, H. S. Garcia, Preparation of whey based probiotic product with *Lactobacillus reuteri* and *Bifidobacterium bifidum*, *Food Technology and Biotechnology*, 45 (2007) 27-31.
- [3] A. Amrane, Y. Prigent, Influence of yeast extract concentration on batch cultures of *Lactobacillus helveticus*: growth and production coupling, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14 (1998) 529-534.
- [4] A. Amrane, Y. Prigent, Lactic acid production rates during different growth phases of *Lactobacillus helveticus* and whey supplemented with yeast extract, *Biotechnology Letters*, 20 (1998) 379-383.
- [5] A. Demirci, A.L. Pometto III, B. Lee, P.N. Hinz, Media evaluation of lactic acid repeated batch fermentation with *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (1998) 4771-4774.
- [6] C.P. Champagne, N. Morin, R. Couture, C. Gagnon, P. Jelen, C. Lacroix, The potential of immobilized cell technology to produce freeze-dried, phage-protected cultures of *Lactococcus lactis*, *Food Research International*, 25 (1992) 419-427.
- [7] P. Cheng, R.E. Mueller, S. Jaeger, R. Bajpai, E.L. Iannotti, Lactic acid production from enzyme-thinned corn starch using *Lactobacillus amylovorus*, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 7 (1991) 27-34.
- [8] Buchta, K., Organic Acid of Minor Importance, in *Biotechnology*, Rehm, H. J., Reed, G. Eds., VCH, Weinheim, 1983, pp. 469-478.
- [9] Kaščák, J. S., Kominek, J., Roehr, M., Lactic Acid, in *Biotechnology*, Rehm, H. J., Reed, G. Eds., VCH, Weinheim, 1996, pp. 294-306.
- [10] R. Gupta, D.N. Gandhi, Effect of some supplementation of some nutrients in whey on the production of lactic acid, *Indian Journal of Dairy Science*, 48 (1995) 636-641.
- [11] D. Roy, J. Goulet, A. LeDuy, Batch fermentation of whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus* for lactic acid production, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 24 (1986) 206-213.
- [12] A. Nancib, N. Nancib, D. Meziane-Cherif, A. Boubendir, M. Fick, J. Boudrant, Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*, *Bioresource Technology*, 96 (2005) 63-67.
- [13] A. Amrane, Evaluation of lactic acid bacteria autolysate for the supplementation of lactic acid bacteria fermentation, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16 (2000) 207-209.
- [14] Mikhlin, E. D., Radina, V. P, Activation of lactic acid bacteria, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 17 (1981) 253-267.
- [15] K. Hofvendahl, E. W. J. van Niel, B. Hahn-Hagerdal, Effect of temperature and pH on growth and product formation of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 growing on maltose, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51 (1999) 669-672.

## Summary

### THE INFLUENCE OF DIFFERENT SUPPLEMENTS ON THE PROBIOTIC CHARACTER OF FERMENTED WHEY-BASED BEVERAGE

Maja Lj. Bulatović<sup>1</sup>, Marica B. Rakin<sup>1</sup>, Maja S. Vukašinović-Sekulić<sup>1</sup>,  
Ljiljana V. Mojović<sup>1</sup>, Tanja Ž. Krnić<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

<sup>2</sup> Innovation Centre of Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

(ORIGINAL SCIENTIFIC PAPER)  
UDK 637.344:641.1

The aim of this study was the selection of appropriate supplements for the probiotic whey-based beverage production by *Lactobacillus johnsonii* NRRL B-2178. The analysis of the main effects and their interactions was performed by using a fractional factorial experimental design through a small number of experiments. After 8h of fermentation of the reconstituted whey, enriched by investigated supplements, a cell number achieved in the probiotic whey-based beverage was determined. By using a statistical analysis, the amount of supplements which are necessary to obtain the maximal number of viable cells in the beverage was also determined.

Based on the obtained results, among all nitrogen sources the yeast extract in the concentration of 1,5 % achieves the most significant influence on the *Lactobacillus johnsonii* NRRL B-2178 growth. As the sources of vitamins and minerals, piridoxal and ZnSO<sub>4</sub> has the most significant influence on the number of cells at concentrations of 0,001 % and 0,3 %, respectively.

By examining the three groups supplements, the largest number of cells approximately 8,80 log(CFU/mL) can be obtained by using the maximum amount of the yeast extract.

**Keywords:** whey, beverage, probiotics, *Lactobacillus*, fermentation